

Experimentelle Untersuchungen zur
Hyaluronidasehemmung durch Bienengift
und Klärung des Wirkungsmechanismus

von

HUGO M. KROTT

1960



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität
München

Direktor: Professor Dr. W. Seitz

Experimentelle Untersuchungen zur Hyaluronidasehemmung
durch Bienengift und Klärung des Wirkungsmechanismus

Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwigs-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Hugo M. Krott
aus
Duisburg
1960



Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent: Professor Dr. W. Seitz
Dekan: Professor Dr. Dr. H. Eyer
Tag der mündlichen Prüfung 21. 12. 1960

Inhaltsverzeichnis

Problematik	4
Eigene Versuche	8
Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse .	17
Diskussion	37
Zusammenfassung	38
Literaturverzeichnis	39

Problematik

Über die Wirkungsweise und die Wirkungsfaktoren der Antirheumatika ist noch wenig bekannt, da wir nur über wenige Testmethoden antirheumatisch wirksamer Substanzen verfügen. Zweifellos spielen analgetische Effekte bei manchen antirheumatischen Erkrankungen eine ausschlaggebende Rolle. Andererseits sind auch rheumatherapeutisch übliche Behandlungsmethoden mit gesicherter antirheumatischer Wirkung bekannt, die keinen analgetischen Erfolg aufweisen. Dies trifft vor allem für Moor- und Schwefelbäder zu, die sich durch eine gewisse Spätwirkung auszeichnen. Hier hat man einer hyaluronidasehemmenden Wirkung zumindest als Teileffekt eine Bedeutung zugeschrieben.

M a t h i e s ¹ hat unter Heranziehung zahlreicher Angaben aus dem bestehenden Schrifttum die Bedeutung einer gesteigerten Hyaluronidaseaktivität in der Pathogenese des Rheumatismus hervorgehoben. Desgleichen wurde erhöhte Permeabilität beschrieben, die zumindest eine Teilfolge der gesteigerten Hyaluronidaseaktivität ist. Diese wiederum soll infolge perikapillären Ödems die Erschwerung des Sauerstoffaustausches zwischen Kapillaren und Gewebe bedingen. Entleimung der Grundsubstanz, Kollagenschwund, fibrinoide Verquellung, Degeneration und Nekrose sowie die zelluläre Reaktion des Granuloms wurden als Folge einer mangelnden Gewebsernährung bezeichnet.

Eine hyaluronidasehemmende Wirkung wurde nicht nur für die erwähnten Antirheumatika ohne analgetischen Effekt nachgewiesen, sondern auch bei Salizylaten, Pyrazol- oder Pyrazolonabkömmlingen sowie bei ACTH und bei den Glukokortikoiden gefunden. Das gleiche gilt auch für Östrogene, Echinacea purpurea und Tocopherol, denen gelegentlich eine Bedeutung in der Behandlung rheumatischer Leiden zugeschrieben wird.

M a t h i e s ²⁻¹⁰ und Mitarbeiter haben den Wirkungsmechanismus dieser hyaluronidasehemmenden Substanzen weitgehend aufklären können. Insbesondere wurde gezeigt, daß der Effekt einer Hemmung der Hyaluronidaseaktivität durch Salizylate, Phenyl-

butazon, Chloräthylbenzmethoxazon, Glukokortikoiden und durch die im Moor wirksamen Substanzen an eine Nebennierenmarkaktivierung mit einer Ausschüttung von Nebennierenmark-Katecholaminen gebunden ist. Im einzelnen haben die Versuche gezeigt, daß der hyaluronidasehemmende Effekt, der bei intakten Ratten signifikant ist, bei adrenaletomierten Tieren ausbleibt, jedoch nach Hypophysektomie erhalten ist. Da nach Versuchen von D o m e n j o z ¹¹ und M a t h i e s ¹⁰ der Ascorbinsäuredepletionseffekt der Nebenniere, der nach S a y e r s und S a y e r s ¹² als Ausdruck einer Nebennierenrindenaktivität zu werten und der bei den obengenannten hyaluronidasehemmenden Stoffen deutlich ist, bei hypophysektomierten Ratten ausbleibt, obwohl der hyaluronidasehemmende Effekt erhalten ist, kann eine sicher nachweisbare Nebennierenrindenstimulierung für das Zustandekommen der hyaluronidasehemmenden Wirkung nicht verantwortlich gemacht werden ¹³. Da aber anderseits die Nebenniere für eine Hemmung der Hyaluronidaseaktivität in vivo erforderlich zu sein scheint, wurde angenommen, daß eine Nebennierenmarkwirkung vorliegt. Dieses konnte durch Versuchsergebnisse von M a t h i e s ¹⁴, S c h e u f e l e ¹⁵ und S c h m i d t ¹⁶, sowie M a t h i e s, G l ü c k, P o u l a n t z a s und S c h m i d t ¹⁷ erhärtet werden, nach denen die Nebennierenmark-Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin nicht nur bei intakten, sondern auch bei adrenaletomierten Ratten eine hyaluronidasehemmende Wirkung erkennen lassen.

Ganglienblocker, die nach E i c h h o l t z ¹⁸ auch eine Blockierung des Nebennierenmarks bedingen, heben in gleichem Sinne wie die Adrenaletomie die hyaluronidasehemmende Wirkung der Antirheumatika, nicht dagegen die der experimentell zugeführten Nebennierenmark-Katecholamine auf ¹⁹.

Ebenso konnte durch die Adrenalytika Ergotamintartrat bez. Regitin der hyaluronidasehemmende Effekt sowohl des Adrenalins als auch des Noradrenalins und auch der obengenannter hyaluronidasehemmender Stoffe blockiert werden ^{17, 20, 21}.

Auf der Suche nach körpereigenen Sustanzen, die im Anschluß an die Katecholaminausschüttung aus dem Nebennierenmark am Wirkungsablauf der Hemmung der Hyaluronidaseaktivität beteiligt sind, haben Mathies und Mitarbeiter²² das Heparin und das Histamin näher untersucht. Sie konnten feststellen, daß beiden Stoffen, deren hyaluronidasehemmende Wirkung in vitro bekannt ist, in niedrigen Dosen auch in vivo hyaluronidasehemmend wirksam sind. Ihr hyaluronidasehemmender Effekt kann durch Protaminsulfat als Heparin-inaktivierende Substanz einerseits und durch Avil als Antihistaminikum andererseits blockiert werden, wobei noch gewisse Wechselwirkungen der blockierenden Stoffe sichtbar werden. Dabei wird auf eine abhängig-gemeinsame Wirkung von Heparin und Histamin geschlossen, was insofern erklärlich erscheint, als Heparin und Histamin in gegenseitiger chemischer Bindung in der Granula der Mastzellen enthalten sind. Die Tatsache, daß auch die hyaluronidasehemmende Wirkung des Adrenalins und Noradrenalins sowie der genannten hyaluronidasehemmender Substanzen durch Protaminsulfat und Antihistaminika aufgehoben wird, läßt die Beteiligung einer Heparin-Histaminwirkung bei Zustandekommen der In-Vivo-Hyaluronidasehemmung möglich erscheinen.

Nachdem aus den erwähnten Versuchsergebnissen eine Arbeitshypothese über die Wirkungsweise hyaluronidasehemmender Substanzen entwickelt werden konnte, erschien es interessant, auch weitere in der Rheumatherapie angewandte Stoffe und Behandlungsmethoden einer eingehenderen Betrachtung zu unterziehen. Im Rahmen dieser Bemühungen wurde in der vorgelegten Arbeit das Bienengift, das in Form des Forapin bei rheumatischen Erkrankungen angewandt wird, näher untersucht.

Die pharmakologische Wirkung des Bienengiftes ist, ebenso wie seine nähere Zusammensetzung, noch keineswegs geklärt²³⁻²⁶. Das als pharmakologisch bedeutsamer Bestandteil nachgewiesene Histamin ist sicher nicht allein für die Wirkungsweise des Giftes verantwortlich. Ebenso fällt dem nach Bienengiftinjektion entstehenden körpereigenen Histamin nur eine partielle Bedeutung zu. Bei der Papierelektrophorese von Nativgift, das über

eine Pikratfällung gereinigt wurde, können drei Fraktionen von Eiweißnatur mit Sicherheit dargestellt werden ²⁷.

Fraktion O scheint ohne pharmakologische Bedeutung zu sein.

Fraktion I wirkt allgemein-toxisch, lokal reizend und direkt hämolytisch. Sie beeinflusst den Blutdruck- und Gefäßapparat und zeigt "curareartige", ganglienerregende und -blockierende Effekte.

Fraktion II besteht aus mindestens zwei Fermenten, einer Phospholipase A und einer Hyaluronidase, denen eine pharmakologische Bedeutung nicht beigemessen wird. Allerdings soll die Hyaluronidase das Eindringen des Giftes in das Gefäßsystem erleichtern, während der Phospholipase A fermentartige Effekte wie die Hemmung der Hitzekoagulation von Eigelb, der Abbau von Thrombokinasen und die Verminderung der Bernsteinsäuredehydrierung zugeschrieben wird.

D i r r und G r a e b e r ²⁸ fanden bei der Behandlung von Rheumatikern mit Forapin eine Hypercholesterinämie, während bei Anwendung derselben Forapinmenge der Cholesterinspiegel bei Nichtrheumatikern normal blieb. Daraus wurde auf eine katalysatorische Wirkung des Bienengiftes geschlossen, daß es auf die im Körper des Rheumatikers vorkommenden Giftstoffe sekundär über das Cholesterin als Schlackenbildner wirkt.

Auffällig im Hinblick auf unsere Betrachtungen ist die Feststellung, daß im Bienengift eine Hyaluronidase enthalten ist, die nach N e u m a n n ²⁹ naturgemäß im In-Vitro-Versuch Hyaluronsäure zu spalten vermag, obwohl wir zunächst im therapeutisch wirksamen Forapin eine hyaluronidasehemmende Wirkung vermuteten. Weiter scheint der Nachweis des im Forapin enthaltenen Histamins, sowie die Freisetzung von körpereigenem Histamin (F e l d b e r g ³⁰) erwähnenswert. Es war also zu untersuchen, ob trotz des Gehaltes an Hyaluronidase im Bienengift dieses die Hyaluronidase zu hemmen vermag und ob eine solche Wirkung dem gleichen Ablauf folgt wie die anderen untersuchten Antirheumatika.

Eigene Versuche

Versuchsanordnung

Wir bedienten uns des Spreading-Testes, da bei dieser Methode eine Hyaluronidasehemmung leicht sicht- und messbar ist. Bei diesem Verfahren setzt man eine bemessene Farbstoff- und eine bemessene Farbstoff-Hyaluronidasequaddel streng intrakutan in die Bauchhaut, um ihre jeweiligen Diffusionsgeschwindigkeiten, gemessen nach 10 Minuten an der äußersten Ausbreitungskontur, in Relation zu setzen. Nach M a d i n a v e i - t i a ³¹ verläuft das Spreading zweiphasig, so daß nur innerhalb der ersten 10 Minuten ein Diffusionseffekt gesichert werden kann, den G i b b i a n ³² mechanisch mit dem Druck erklärt, den das Flüssigkeitsdepot auf seine Umgebung ausübt. Nach Ablauf der ersten 10 Minuten würden dann Resorptionsmechanismen im Vordergrund stehen.

Als Versuchstiere dienten männliche weiße Ratten im Gewicht von 150 bis 220 g. Nach kurzem, einleitenden Ätherrausch wurde eine Evipannarkose durchgeführt (30 mg Evipan-Natrium/ 100 g Tier s.c.), die nach W i l h e l m i ³³ keinen störenden Einfluß auf die Hyaluronidaseaktivität nimmt. Es wurde in die mit Pilca enthaarte Bauchhaut eine Farbstoffquaddel von 0,1 ccm einer 6 %-igen Evansblau-Stammlösung gesetzt. Zur Herstellung der Farbstoff-Hyaluronidaselösung wurde eine Trockenampulle Hyaluronidase (Kinetin) mit 150 IE. in 2 ccm der obengenannten Farbstoffverdünnung gelöst, so daß bei Injektion von 0,1 ccm Farbstoff-Hyaluronidaselösung 7,5 IE. zur Wirkung kamen. Die äußerste Umgrenzung der Farbstoffinseln wurde 10 Minuten post iniectionem auf durchsichtiges Zelluloid übertragen und anschließend planimetrisch in qmm gemessen.

Die Versuche wurden sowohl an intakten, als auch an 24 Stunden vorher hypophysektomierten und 48 Stunden vorher adrenalektomierten Tieren durchgeführt. Die operierten Ratten erhielten in der Zwischenzeit eine kohlehydratreiche Ernährung (Haferflocken, Zucker) und zur Aufrechterhaltung der Isotonie physiologische Kochsalzlösung. Nach Untersuchungen von

K a r g ³⁴ auf Grund von Messungen des nebennierenbedingten Grundumsatzes und der Ergebnisse des Thorn-Testes ist bei adrenaletomierten Tieren 48 Stunden nach dem Eingriff eine Regeneration von funktionstüchtigem akzessorischen Nebennierengewebe nicht zu erwarten. Innerhalb dieser Zeit zeigt der Grundumsatz sein Minimum, und auch der Thorn-Test fällt negativ aus. Ein Wiederanstieg des Grundumsatzes wurde erst 2 bis 3 Tage danach festgestellt.

Versuchsreihen

Bei jedem Versuchstier wurde, vor Beginn des eigentlichen Versuchs, ein Leerversuch mit einer reinen Farbstoff- und einer Farbstoff-Hyaluronidaselösung durchgeführt. Danach wurden jeweils 0,2 ccm/100 g Tier Bienengift intrakutan in die Brusthaut gespritzt. Wir gebrauchten eine standardisierte isotonische Bienengiftlösung mit 0,2% Procainhydrochlorid (Forapin), die in 2 ccm 0,6 Bienengift-Einheiten enthält. (Eine Bienengift-Einheit entspricht der durchschnittlichen Giftmenge einer Frühjahrsbiene.)

Der obenbeschriebene Leerversuch ist allen folgenden Versuchsreihen gemeinsam und wird deshalb nur noch stichwortlich erwähnt. Sofern nicht besonders betont, wurde der Test mit intakten Ratten durchgeführt.

1. Versuchsreihe

Leerversuch; Bienengiftapplikation. 20 und 40 Minuten nach Forapingabe wurden jeweils Quaddelpaare gesetzt und deren Ausbreitung nach 10 Minuten gemessen.

Die Einzelergebnisse gehen aus Tabelle 1 hervor.

2. Versuchsreihe

Leerversuch; Bienengiftapplikation. Bei gleicher Testanordnung wie in der ersten Versuchsreihe wurden nur die Zeiten auf 90 und 120 Minuten nach Forapingabe verlängert.

Die Einzelergebnisse gehen aus Tabelle 2 hervor.

3. Versuchsreihe

Leerversuch; Bienengiftapplikation. Bei gleicher Testanordnung wie in der ersten Versuchsreihe wurden die Zeiten weiter auf 120 und 150 Minuten nach Forapingabe verlängert. Die Einzelergebnisse gehen aus Tabelle 3 hervor.

4. Versuchsreihe mit hypophysektomierten Tieren

Leerversuch; Bienengiftapplikation. 20 und 40 Minuten nach Forapingabe wurde auf obenbeschriebene Art die Hyaluronidasehemmung bestimmt.

Die Einzelergebnisse gehen aus Tabelle 4 hervor.

5. Versuchsreihe mit adrenaletomierten Tieren

Leerversuch; Bienengiftapplikation. 20 und 40 Minuten nach Forapingabe wurde auf obenbeschriebene Art die Hyaluronidasehemmung bestimmt.

Die Einzelergebnisse gehen aus Tabelle 5 hervor.

6. Versuchsreihe

Leerversuch; 30 Minuten vor Forapingabe wurden 5 mg/100 g Tier Pendiomid in die Femoralvene gespritzt. 20 und 40 Minuten nach Forapingabe wurde dann auf obenbeschriebene Art die Hyaluronidasehemmung bestimmt.

Die Einzelergebnisse gehen aus Tabelle 6 hervor.

7. Versuchsreihe

Leerversuch. 30 Minuten vor Forapingabe wurden 0,8 mg/100 g Tier Ergotamintartrat (Gynergen) s.c. gespritzt. 20 und 40 Minuten nach Bienengiftapplikation wurde auf die obenbeschriebene Art die Hyaluronidasehemmung bestimmt.

8. Versuchsreihe

Leerversuch. 30 Minuten vor und gleichzeitig mit der Forapingabe wurden je 0,8 mg/100 g Tier Ergotamintartrat s.c. gespritzt. 20 und 40 Minuten nach Bienengiftapplikation wurde auf die obenbeschriebene Art die Hyaluronidasehemmung bestimmt. Die Einzelergebnisse gehen aus Tabelle 8 hervor.

9. Versuchsreihe

Leerversuch. Gleichzeitig mit der Forapingabe wurden 1,5 mg pro Tier Protaminsulfat in die Femoralvene gespritzt und die gleiche Dosis Protaminsulfat 30 Minuten später nachgespritzt. 20 und 40 Minuten nach Bienengiftapplikation wurde auf die obenbeschriebene Art die Hyaluronidasehemmung bestimmt. Die Einzelergebnisse gehen aus Tabelle 9 hervor.

10. Versuchsreihe

Leerversuch. 30 Minuten vor Forapingabe wurden 5 mg/100 g Tier Avil s.c. gespritzt. 20 und 40 Minuten nach Bienengiftapplikation wurde auf die obenbeschriebene Art die Hyaluronidasehemmung bestimmt.

Die Einzelergebnisse gehen aus Tabelle 10 hervor.

11. Versuchsreihe

Leerversuch. 30 Minuten vor und gleichzeitig mit der Forapingabe wurden 5 mg/100 g Tier Avil s.c. gespritzt. 20 und 40 Minuten nach Bienengiftapplikation wurde auf die obenbeschriebene Art die Hyaluronidasehemmung bestimmt.

Die Einzelergebnisse gehen aus Tabelle 11 hervor.

Als Abkürzungen in den folgenden Tabellen wurden für Farbstoffquaddel F-Q und für Farbstoffhyaluronidasequaddel F-H-Q verwandt.

Normal-Tiere		Leer-Versuch		20' nach Forapingabe		40' nach Forapingabe	
Nr	g	F-Q	F-H-Q	F-Q	F-H-Q	F-Q	F-H-Q
1	200	130	181	125	140	117	114
2	170	115	165	107	113	123	100
3	180	120	174	122	126	127	104
4	150	121	171	126	130	120	103
5	160	115	177	105	118	108	95
6	190	120	178	125	129	108	110

- Tabelle 1 -

Normal-Tiere		Leer-Versuch		90' nach Forapingabe		120' nach Forapingabe	
Nr	g	F-Q	F-H-Q	F-Q	F-H-Q	F-Q	F-H-Q
7	190	130	184	124	159	130	167
8	220	125	200	132	148	114	160
9	220	117	178	126	129	119	153
10	180	128	195	120	138	123	166
11	190	131	205	114	149	132	160
12	220	123	182	112	142	129	151

- Tabelle 2 -

Normal-Tiere		Leer-Versuch		120' nach Forapingabe		150' nach Forapingabe	
Nr	g	F-Q	F-H-Q	F-Q	F-H-Q	F-Q	F-H-Q
13	200	131	200	115	160	121	171
14	190	130	205	118	164	116	169
15	220	124	180	121	153	109	160
16	200	127	185	122	151	120	155
17	180	125	195	110	161	108	170
18	210	121	179	117	156	115	160

- Tabelle 3 -

Hypophysektomierte Tiere

Tiere		Leer-Versuch		20' nach Forapingabe		40' nach Forapingabe	
Nr	g	F-Q	F-H-Q	F-Q	F-H-Q	F-Q	F-H-Q
19	200	120	205	120	125	110	120
20	180	115	200	120	130	110	118
21	200	110	190	105	124	115	118
22	180	118	194	120	130	120	125
23	190	115	187	117	122	120	118

- Tabelle 4 -

Adrenalektomierte Tiere

Tiere		Leer-Versuch		20' nach Forapingabe		40' nach Forapingabe	
Nr	g	F-Q	F-H-Q	F-Q	F-H-Q	F-Q	F-H-Q
24	180	118	200	111	187	114	177
25	190	110	192	118	182	109	177
26	190	108	183	113	170	119	169
27	170	131	201	124	194	120	190
28	190	121	178	118	173	123	168
29	150	121	190	124	183	112	180

- Tabelle 5 -

Pendiomid 5 mg/100 g Tier i.v. 30' vor Forapingabe

Normal-Tiere		Leer-Versuch		20' nach Forapingabe		40' nach Forapingabe	
Nr	g	F-Q	F-H-Q	F-Q	F-H-Q	F-Q	F-H-Q
30	190	108	187	119	183	124	180
31	190	116	178	120	173	118	168
32	180	105	187	118	193	125	179
33	200	120	182	131	174	112	175
34	190	118	190	109	180	123	183
35	180	100	167	112	172	108	164

- Tabelle 6 -

Ergotamintartrat 0,8 mg/100 g Tier s.c. 30' vor Forapingabe

Normal-Tiere		Leer-Versuch		20' nach Forapingabe		40' nach Forapingabe	
Nr	g	F-Q	F-H-Q	F-Q	F-H-Q	F-Q	F-H-Q
36	170	100	182	100	174	121	157
37	150	124	205	115	189	122	173
38	170	112	173	121	168	117	153
39	180	92	182	125	170	111	160
40	150	118	192	124	185	101	167
41	170	131	188	125	184	116	167

- Tabelle 7 -

Ergotamintartrat 0,8 mg/100 g Tier s.c. 30' vor und gleichzeitig mit Forapingabe

Normal-Tiere		Leer-Versuch		20' nach Forapingabe		40' nach Forapingabe	
Nr	g	F-Q	F-H-Q	F-Q	F-H-Q	F-Q	F-H-Q
42	150	132	182	120	177	114	173
43	160	124	215	130	205	121	195
44	150	114	208	118	195	120	197
45	150	115	175	102	177	109	172
46	150	130	200	125	194	120	191
47	150	118	194	121	187	112	183

- Tabelle 8 -

Protaminsulfat 1,5 mg pro Tier i.v. gleichzeitig mit und 30' nach Forapingabe

Normal-Tiere		Leer-Versuch		20' nach Forapingabe		40' nach Forapingabe	
Nr	g	F-Q	F-H-Q	F-Q	F-H-Q	F-Q	F-H-Q
8	170	131	189	122	178	128	184
9	200	109	173	110	160	113	187
10	180	134	205	127	189	130	197
11	180	114	192	123	182	127	210
12	180	129	169	118	165	113	176
13	190	115	161	117	157	120	164

- Tabelle 9 -

Avil 5 mg/100 g Tier s.c. 30' vor Forapingabe

Normal- Tiere		Leer- Versuch		20' nach Forapingabe		40' nach Forapingabe	
Nr	g	F-Q	F-H-Q	F-Q	F-H-Q	F-Q	F-H-Q
54	160	119	200	123	189	112	182
55	170	109	192	121	180	118	167
56	190	131	212	124	200	126	187
57	180	118	203	126	193	123	180
58	180	124	185	118	176	112	164
59	190	98	167	102	164	110	151

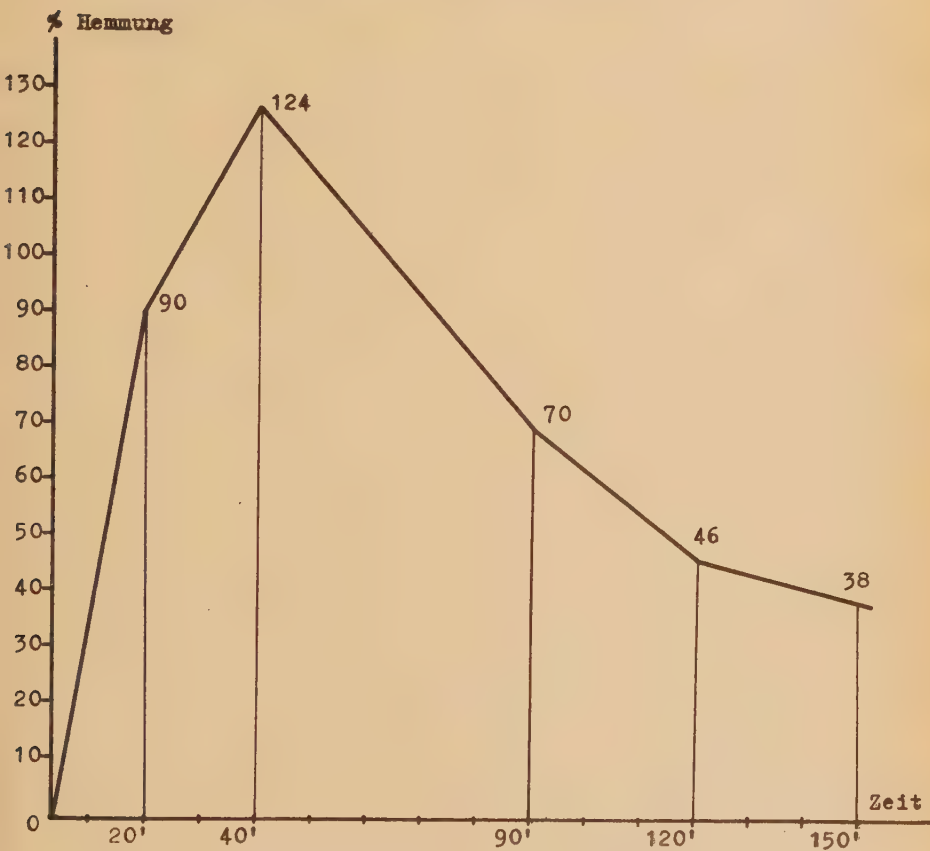
- Tabelle 10 -

Avil 5 mg/100 g Tier s.c. 30' vor und gleichzeitig
mit Forapingabe

Normal- Tiere		Leer- Versuch		20' nach Forapingabe		40' nach Forapingabe	
Nr	g	F-Q	F-H-Q	F-Q	F-H-Q	F-Q	F-H-Q
60	180	108	179	121	173	118	174
61	160	130	198	128	193	133	206
62	160	131	204	121	193	125	200
63	170	118	187	130	190	124	193
64	160	110	190	114	181	130	183
65	180	129	200	119	202	124	205

- Tabelle 11 -

0,2 cm/100 g Tier Forapin i.c. bei intakten Tieren



- Abbildung 1 -

Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse

1. Statistisches Modell und Methodik

Primäre Aufgabe der statistischen Auswertung von Versuchsergebnissen ist es, die Gesamt-Variabilität der beobachteten Werte in zwei Haupt-Komponenten zu zerlegen, und zwar in eine Komponente, die durch systematische Faktoren bedingt ist und eine andere Komponente, welche die experimentelle Variabilität darstellt. Diejenige Komponente der Gesamt-Variabilität, die durch systematische Faktoren bedingt ist, muß selber noch in so viele Komponenten zerlegt werden, als systematische Faktoren bei dem betreffenden Versuch zu berücksichtigen sind. Im Falle der vorliegenden Versuche muß prinzipiell mit zwei verschiedenen Arten von systematischen Faktoren gerechnet werden, nämlich einmal dem Einfluß des jeweiligen Versuchstieres und zum anderen dem Einfluß des jeweiligen "Verfahrens". Bei der hier vorliegenden Versuchsanordnung hat man zwischen sechs verschiedenen "Verfahren" zu unterscheiden, nämlich je zwei Kontroll-Quaddeln (Farbstoff-Kontrolle und Farbstoff+Hyaluronidase-Kontrolle) und je zwei Versuchszeiten für jeden Quaddel-Typus (zwei Versuchszeiten für die reine Farbstoff-Quaddel und zwei Versuchszeiten für die Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel). Die Erfahrung bei der Auswertung früherer Versuche, insbesondere bei der Auswertung methodischer Versuche hat gezeigt, daß man diesen systematischen Einflüssen am besten gerecht wird, wenn man der statistischen Auswertung ein **l i n e a r e s** Modell zugrunde legt. Bezeichnet man einen Messwert, der zu dem Verfahren V gehört und an dem Versuchstier T bestimmt wurde mit

$$x(T:V),$$

so wird bei diesem Modell angenommen, daß sich dieser Messwert in der nachstehenden Form darstellen läßt:

$$x(T:V) = a_T + b_V + e.$$

Hierin bedeuten die beiden Größen a_T und b_V konstante Parameter, die nur von dem jeweiligen Versuchstier T bzw. von dem jeweiligen "Verfahren" V abhängen und außerdem voneinander unabhängig sind. Diese beiden Parameter bringen den systematischen Einfluß des jeweiligen Versuchstieres bzw. des jeweiligen Verfahrens auf den Meßwert zum Ausdruck. Die Größe e dagegen ist der Ausdruck desjenigen Anteils der Variabilität der Meßwerte, der durch zufällige Einflüsse bedingt ist und den wir weiterhin mit "experimentelle Variabilität" bezeichnen. Das angegebene Modell ist jedoch nur dann vollständig, wenn man über die Größe e bestimmte Voraussetzungen macht. Diese lauten dahingehend, daß e eine normalverteilte Zufallsvariable ist, mit dem Erwartungswert 0 und einer Varianz s^2 , die nur von der Versuchsanordnung, jedoch nicht von dem jeweiligen Versuchstier bzw. von der jeweiligen Versuchszeit abhängt.

Aufgabe der statistischen Auswertung ist es, nach Festlegung des statistischen Modelles, optimale Schätzungen für die Parameter, die in dieses Modell eingehen und für die experimentelle Variabilität zu ermitteln. Dies geschieht im vorliegenden Falle nach der "Methode der kleinsten Quadrate", wobei die experimentelle Variabilität mit Hilfe einer zweifachen Varianz-Analyse geschätzt wird. In den Varianz-Analysen ergibt sich diese Schätzung als "Rest-Varianz".

Hinsichtlich der Schätzung der Parameter sei hier nur erwähnt, in welcher Weise die Parameter b_V , die zu den verschiedenen Verfahren des Versuches gehören, geschätzt werden. Es bedeutet hierzu $\bar{x}(V)$ das arithmetische Mittel aus allen Meßwerten, die für das Verfahren V an sämtlichen Versuchstieren einer Versuchsreihe beobachtet wurden. Bei passender Normierung der individuellen Konstanten a_T der einzelnen Versuchstiere, ist dann $\bar{x}(V)$ eine optimale Schätzung im Sinne der "Methode der kleinsten Quadrate" für den Parameter b_V , welcher zu dem Verfahren V gehört. Innerhalb einer Versuchsreihe liegt eine Veränderung in der Diffusionsgeschwindigkeit eines Quaddel-Typus nur dann vor, wenn die zu den Versuchszeiten gehörigen Parameter b_V sich von den Parametern unterscheiden, welche zu den Kontroll-Verfahren gehören. Zur statistischen Prüfung der Frage, ob in einer Versuchsreihe

Ob eine solche Veränderung der Diffusionsgeschwindigkeit vorliegt, war daher zu prüfen, ob die beobachteten Meßwerte mit der Hypothese verträglich sind, daß die zu den Versuchszeiten gehörigen Parameter b_v eines Quaddel-Typus mit dem Parameter b_v übereinstimmen, welcher zu dem Kontroll-Verfahren dieses Quaddel-Typus gehört. Trifft dies nicht zu, so kann als statistisch gesichert gelten, daß während der Versuchsreihe eine Änderung der Diffusionsgeschwindigkeit des betreffenden Quaddel-Typus aufgetreten ist.

Bei der vorliegenden Versuchsanordnung wird die obengenannte Hypothese am zweckmäßigsten mit Hilfe einer zweifachen Varianz-Analyse geprüft, in welcher zunächst einmal der systematische Einfluß der Versuchstiere als "Varianz zwischen den Tieren" ermittelt wird, und somit aus der experimentellen Variabilität eliminiert wird. Die Gesamt-Variabilität "zwischen den Verfahren" wird dann entsprechend der Fragestellung des Versuches mit Hilfe von orthogonalen Vergleichen weiter unterteilt.

Zunächst wird für jeden Quaddel-Typus geprüft, ob zwischen der "Kontrolle" und den "Versuchszeiten" statistisch gesicherte Unterschiede bestehen. Weiter wird dann geprüft, ob zwischen den "Versuchszeiten" selber ebenfalls statistisch gesicherte Unterschiede vorliegen. Nur dann, wenn mindestens einer dieser orthogonalen Vergleiche das Ergebnis liefert, daß ein statistisch gesicherter Unterschied zwischen den miteinander verglichenen Verfahren vorliegt, kann behauptet werden, daß eine statistisch gesicherte Veränderung in der Diffusionsgeschwindigkeit des betrachteten Quaddel-Typus während des Versuches eingetreten ist.

Um weiter zu ermitteln, in welcher Richtung die Veränderung der Diffusionsgeschwindigkeit eines Quaddel-Typus erfolgt ist und von welcher Größenordnung diese Veränderung ist, hat man die Differenz zwischen den Parametern zu bestimmen, welche zu den Versuchszeiten und der Kontrolle gehören. Für diese Unterschiede lassen sich selbstverständlich aus den Versuchen nur Schätzwerte ermitteln, diese Schätzwerte stellen sich in der Form der Mittelwertdifferenz

$$d \bar{x}(t) = \bar{x}(t) - \bar{x}(K)$$

dar, wobei $\bar{x}(K)$ derjenige Mittelwert ist, der zu der Kontrolle gehört. Eine Hemmung der Diffusionsgeschwindigkeit zum Zeitpunkt t des Versuches gegenüber dem Ausgangswert liegt nur dann vor, wenn die zugehörige Mittelwertsdifferenz $d\bar{x}(t)$ einen negativen Wert besitzt.

Aus Gründen der experimentellen Technik konnten bei den vorliegenden Versuchen keine Doppelbestimmungen am gleichen Versuchstier zur gleichen Versuchszeit durchgeführt werden (auf Grund der beschränkten Bauchhautgröße der Versuchstiere); daher konnte die Richtigkeit des zugrunde gelegten statistischen Modelles auch nicht unmittelbar mit Hilfe der vorliegenden Versuche geprüft werden. Dabei ist unter "Richtigkeit" eine angemessene Übereinstimmung zwischen den Werten, die auf Grund des statistischen Modelles erwartet werden müßten und denjenigen Werten, die tatsächlich beobachtet worden sind, zu verstehen. Immerhin gibt es eine Möglichkeit wenigstens abzuschätzen, ob das gewählte Modell vernünftig ist. Hierzu wird folgendermaßen vorgegangen.

Die zu einem Verfahren gehörigen Meßwerte sämtlicher Versuchstiere weisen eine bestimmte Variabilität auf, als deren Maß wir die empirische Varianz $s^2(V)$ dieser Meßwerte ansahen. Wenn das gewählte statistische Modell den realen Sachverhalt in angemessener Weise wiedergibt, muß erwartet werden, daß die zu verschiedenen Zeiten gehörigen empirischen Varianzen $s^2(V)$ alles Schätzungswerte der gleichen übergeordneten Varianz sind, d.h. daß sie untereinander homogen sein müssen. Ob diese Annahme zutrifft, kann mit Hilfe des BARTLETT-Tests geprüft werden. Bei allen Versuchsreihen wurde daher auch der BARTLETT-Test durchgeführt. Es sei jedoch bemerkt, daß es sich hier mehr um eine Plausibilitäts-Betrachtung handelt als um einen exakten statistischen Test zur Prüfung der Richtigkeit des Modelles.

2. Darstellung der Ergebnisse der statistischen Auswertung

Das Ergebnis der durchgeführten Varianz-Analysen haben wir in den Tabellen dargestellt. Es bedeutet in den Schemata der Varianz-Analysen:

- n: die Zahl der Freiheitsgrade der Varianz-Komponente;
SAQ: das Summen-Abstands-Quadrat der Varianz-Komponente;
MAQ: das Mittlere-Abstands-Quadrat der Varianz-Komponente;
 $F_{\text{emp.}}$: der Varianz-Quotient zwischen der jeweiligen Varianz-Komponente und der experimentellen Variabilität (Rest-Varianz);
p: die Überschreitungswahrscheinlichkeit des Varianz-Quotienten $F_{\text{emp.}}$ in der zugehörigen F-Prüfverteilung.

Am Fuße jeder Varianz-Analyse ist das Ergebnis des BARTLETT-Tests angegeben, den wir zur Prüfung der Übereinstimmung zwischen dem gewählten Modell und dem realen Sachverhalt durchführten. Es bedeutet hierin: "n" die Zahl der Freiheitsgrade der Chi-Quadrat-Verteilung, welcher die Prüfgröße $\chi^2_{\text{emp.}}$ genügt, wenn die Hypothese zutrifft, daß die verglichenen Varianzen $s^2(V)$ untereinander homogen seien.

Die Mittelwerte $\bar{x}(V)$ der an den Versuchstieren beobachteten Werte der einzelnen Verfahren, die empirischen Varianzen $s^2(V)$ zwischen diesen Werten und die Mittelwertsdifferenzen $d \bar{x}(t) = \bar{x}(t) - \bar{x}(K)$ finden sich ebenfalls in diesen Tabellen. Soweit sich aus den Varianz-Analysen ergeben hat, daß die Diffusionsgeschwindigkeiten zu einzelnen Zeitpunkten einer Versuchsreihe von denjenigen der Kontrolle statistisch gesichert verschieden sind, haben wir in diesen Tabellen auch das Ergebnis des orthogonalen Vergleichs angegeben, welcher zur Prüfung dieses Unterschiedes durchgeführt wurde. Hierzu wurde in der mit "Sicherung" überschriebenen Spalte angeführt, mit welcher Irrtumswahrscheinlichkeit behauptet werden kann, die betreffende Mittelwertsdifferenz $d \bar{x}(t)$ sei gesichert von 0 verschieden. Nur wenn diese Irrtumswahrscheinlichkeit nicht größer als 5 % ist, kann behauptet werden, daß zu dem betreffenden Zeitpunkt eine statistisch gesicherte Veränderung in der Diffusionsgeschwindigkeit des betreffenden Quaddel-Typus gegenüber der Kontrolle vor Applikation der Prüf-Substanz vorliegt. Eine ausreichende statistische Sicherung für diese Behauptung liegt allerdings erst dann vor, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit nicht größer als 1 % ist. Schließlich enthalten die Tabellen noch die in üblicher Weise berechnete prozentuale Hemmung für jeden Zeitpunkt des Versuches.

3. Diskussion der Ergebnisse der statistischen Auswertung

Der BARTLETT-Test ergab in keiner Versuchsreihe eine Prüfgröße $\chi^2_{\text{emp.}}$, deren Überschreitungswahrscheinlichkeit kleiner als 5 % ist. Es liegt somit in keinem Falle eine Veranlassung vor, die Hypothese, die dem Test zugrunde liegt, zu verwerfen. Die Abweichungen des realen Sachverhaltes in dem theoretischen Modell können somit als zufällig angesehen werden.

Das Ergebnis der statistischen Auswertung über die Diffusionsgeschwindigkeiten der beiden Quaddel-Typen soll nunmehr für die einzelnen Versuchsreihen getrennt besprochen werden.

Versuchsreihe 1: In dieser Versuchsreihe läßt sich eine statistisch gesicherte Veränderung in der Diffusionsgeschwindigkeit der reinen Farbstoff-Quaddel gegenüber der Kontrolle nur bei der Teilversuchsreihe a) nachweisen. Es liegt hier eine Hemmung der Diffusion der reinen Farbstoff-Quaddel vor, die statistisch hoch gesichert ist.

Eine statistisch gesicherte Veränderung in der Diffusionsgeschwindigkeit der Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel zu den Versuchszeiten gegenüber der Kontrolle konnte in sämtlichen Teilversuchsreihen nachgewiesen werden. Aus dem Vorzeichen der Mittelwertsdifferenz $d \bar{x}(t)$ ergibt sich, daß es sich hierbei um eine Hemmung der Hyaluronidase-Aktivität handelt, die ihren maximalen Wert zum Zeitpunkt 40' p.i. annimmt.

Versuchsreihe 2: Eine Veränderung in der Diffusionsgeschwindigkeit der reinen Farbstoff-Quaddel zu den Versuchszeiten gegenüber der Kontrolle konnte in dieser Versuchsreihe nicht nachgewiesen werden. Dagegen liegt eine statistisch gesicherte Veränderung in der Diffusionsgeschwindigkeit der Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel zu den Versuchszeiten gegenüber der Kontrolle vor; außerdem unterscheiden sich auch noch die beiden Versuchszeiten dieses Quaddel-Typus in statistisch gesicherter Weise. Wie sich aus dem Vorzeichen der Mittelwertsdifferenz $d \bar{x}(t)$ ergibt, handelt es sich hierbei um eine Hemmung der Hyaluronidase-Aktivität, welche ihre maxi-

male Größe zum Zeitpunkt 40' p.i. besitzt. Der Vergleich der Mittelwertsdifferenz zum Zeitpunkt 40' p.i. in dieser Versuchsreihe mit der entsprechenden Mittelwertsdifferenz der Versuchsreihe 1 zeigt, daß durch die Applikation von AVIL eine wesentliche Reduktion der hyaluronidase-hemmenden Aktivität des FORAPINS bewirkt worden ist.

Versuchsreihe 3: Auch in dieser Versuchsreihe konnte eine Veränderung in der Diffusionsgeschwindigkeit der reinen Farbstoff-Quaddel zu den Versuchszeiten gegenüber der Kontrolle nicht nachgewiesen werden. Ein entsprechendes Ergebnis gilt für die Diffusionsgeschwindigkeit der Farbstoff-Hyaluronidase-Quaddel, wo ebenfalls keine Veränderung gegenüber der Kontrolle statistisch gesichert werden konnte.

Versuchsreihe 4: Bei dieser Versuchsreihe liegt keine statistisch gesicherte Veränderung in der Diffusionsgeschwindigkeit der reinen Farbstoff-Quaddel gegenüber der Kontrolle vor; dagegen konnte eine gesicherte Veränderung in der Diffusionsgeschwindigkeit der Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel zu den Versuchszeiten gegenüber der Kontrolle nachgewiesen werden. Darüber hinaus unterscheiden sich auch noch die beiden Versuchszeiten hinsichtlich der Diffusionsgeschwindigkeit der Farbstoff-Hyaluronidase-Quaddel. Aus dem Vorzeichen der Mittelwertsdifferenz $\bar{d} \bar{x}(t)$ ergibt sich, daß es sich um eine Hemmung der Hyaluronidase-Aktivität handelt, die ihren maximalen Wert zum Zeitpunkt 40' p.i. besitzt. Auch hier zeigt wiederum die Größe der Mittelwertsdifferenz $\bar{d} \bar{x}(t)$ an, daß in dieser Versuchsreihe die hyaluronidase-hemmende Aktivität des FORAPINS durch die Applikation von ERGOTAMIN reduziert werden konnte.

Versuchsreihe 5: Eine statistisch gesicherte Veränderung in der Diffusionsgeschwindigkeit der reinen Farbstoff-Quaddel konnte auch in dieser Versuchsreihe nicht nachgewiesen werden. Dagegen liegt eine statistisch gesicherte Veränderung in der Diffusionsgeschwindigkeit der Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddeln zu den Versuchszeiten gegenüber der Kontrolle vor; die Versuchszeiten selber unterscheiden sich nicht untereinander. Das Vorzeichen der Mittelwerts-

ifferenz d $\bar{x}(t)$ zeigt an, daß es sich hierbei um eine Hemmung der Hyaluronidase-Aktivität handelt; die Größe von d $\bar{x}(t)$ zeigt weiter, daß diese Hemmung der Hyaluronidase-Aktivität wesentlich kleiner ist als in der Versuchsreihe 1 bzw. der Versuchsreihe 4. Durch die nochmalige Applikation von ERGOTAMIN wurde daher die hyaluronidase-hemmende Wirkung des FORAPINs weiter reduziert.

Versuchsreihe 6: In dieser Versuchsreihe erfährt die Diffusionsgeschwindigkeit der reinen Farbstoff-Quaddel keine statistisch faßbaren Veränderungen zu den Versuchszeiten gegenüber der Kontrolle. Die Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddeln der Versuchszeiten dagegen unterscheiden sich untereinander; die Mittelwertsdifferenzen d $\bar{x}(t)$ zeigen, daß zu dem Zeitpunkt 20' p.i. eine Hemmung der Hyaluronidase-Aktivität vorliegt, zum Zeitpunkt 40' p.i. eine Vergrößerung der Hyaluronidase-Aktivität. Gegenüber der Kontrolle konnte nur die Hemmung 20' p.i. statistisch gesichert werden.

Versuchsreihe 7: In dieser Versuchsreihe liegt eine statistisch schwach gesicherte Veränderung in der Diffusionsgeschwindigkeit der reinen Farbstoff-Quaddel gegenüber der Kontrolle vor; es handelt sich um eine Vergrößerung der reinen Farbstoff-Quaddel. Eine statistisch faßbare Veränderung der Diffusionsgeschwindigkeit der Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel gegenüber der Kontrolle konnte in dieser Versuchsreihe nicht festgestellt werden.

Versuchsreihe 8: Bei dieser Versuchsreihe liegt keine statistisch gesicherte Veränderung in dem Verhalten der reinen Farbstoff-Quaddel vor; dagegen unterscheidet sich die Diffusionsgeschwindigkeit der Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel zu den Versuchszeiten gegenüber der Kontrolle in statistisch gesicherter Weise. Größe und Vorzeichen der Mittelwertsdifferenz d $\bar{x}(t)$ geben an, daß es sich hierbei um eine Hemmung der Hyaluronidase-Aktivität handelt, die ihr Maximum zum Zeitpunkt 40' p.i. annimmt. Die Größe von d $\bar{x}(t)$ zum Zeitpunkt 40' p.i. zeigt an, daß durch die Adrenalectomie die hyaluronidase-hemmende Wirkung des FORAPINs wesentlich herabgesetzt wurde.

Versuchsreihe 9: Bei dieser Versuchsreihe liegt wiederum keine statistisch faßbare Veränderung in der Diffusionsgeschwindigkeit der reinen Farbstoff-Quaddel vor; dagegen liegt eine hoch gesicherte Veränderung in der Diffusionsgeschwindigkeit der Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel zu den Versuchszeiten gegenüber der Kontrolle vor; außerdem liegen auch noch gesicherte Unterschiede zwischen den beiden Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddeln zu den Versuchszeiten vor. Es handelt sich hierbei um eine Hemmung der Hyaluronidase-Aktivität, die aus dem Vorzeichen der Mittelwertsdifferenz $d \bar{x}(t)$ folgt; die Größe der Mittelwertsdifferenz deutet an, daß durch die Hypophysektomie keine Veränderung in der hyaluronidase-hemmenden Aktivität des FORAPINs bewirkt wird. Es hat vielmehr den Anschein, als würde durch die Hypophysektomie der Eintritt der maximalen Hemmung noch beschleunigt.

Normaltiere

F O R A P I N

20' und 40'

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p.
zwischen Tieren	5	955	191	5.79	1 %
zwischen Verfahren	5	17.840	3.568	100.00	0.1 %
Zw. Quaddel-Typen	1	2.401	2.401	72.76	0.1 %
Zw. Kontr.u.V.-Zeiten (Farbstoff)	1	23	23	-	
Zw. Versuchs-Zeiten (Farbstoff)	1	4	4	-	
Zw. Kontr.u.V.-Zeiten (Hyaluronidase)	1	14.003	14.003	100.00	0.1 %
Zw. Versuchs-Zeiten (Hyaluronidase)	1	1.408	1.408	2.51	-
Rest - Varianz	25	820	33		
Gesamt - Varianz	35	19.615	560		

$\chi^2_{emp.} = 2.815; 70 \% < p.$

	$\bar{x}(V)$	$s^2(V)$	$\bar{x}(t) - \bar{x}(K)$	Hemmung	Sicherung
E_V	120	30			
H_V	174	33			
$E_{20'}$	118	93	- 2		-
$H_{20'}$	126	91	- 48	86.6 %	0.1 %
$E_{40'}$	117	61	- 3		-
$H_{40'}$	104	47	- 70	125.4 %	0.1 %

Normaltiere

F O R A P I N

90' und 120'

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p.
Zwischen Tieren	5	710	142	3.84	1 %
Zwischen Verfahren	5	21.886	4.377	100.00	0.1 %
Zw. Quaddel-Typen	1	15.088	15.088	100.00	0.1 %
Zw. Kontr.u.V.-Zeiten (Farbstoff)	1	30	30	-	
Zw. Versuchs-Zeiten (Farbstoff)	1	30	30	-	
Zw. Kontr.u.V.-Zeiten (Hyaluronidase)	1	6.032	6.032	100.00	0.1 %
Zw. Versuchs-Zeiten (Hyaluronidase)	1	705	705	19.05	0.1 %
Rest - Varianz	25	1.296	37		
Gesamt - Varianz	35	23.892	683		

n = 5; $\chi^2_{\text{emp.}} = 3.909$; 50 % < p.

	$\bar{x}(V)$	$s^2(V)$	$\bar{x}(t) - \bar{x}(K)$	Hemmung	Sicherung
E _v	126	27			
H _v	191	118			
E _{90'}	121	57	- 5		-
H _{90'}	144	106	- 47	69.6 %	0.1 %
E _{120'}	124	50	- 2		-
H _{120'}	159	43	- 32	46.6 %	0.1 %

Normaltiere

F O R A P I N

120' und 150'

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p.
Zwischen Tieren	5	497	99	3.30	5 %
Zwischen Verfahren	5	27.797	5.559	100.00	0.1 %
Zw. Quaddel-Typen	1	23.665	23.665	100.00	0.1 %
Zw. Kontr.u.V.-Zeiten (Farbstoff)	1	420	420	14.00	0.1 %
Zw. Versuchs-Zeiten (Farbstoff)	1	19	19	-	
Zw. Kontr.u.V.-Zeiten (Hyaluronidase)	1	3.560	3.560	100.00	0.1 %
Zw. Versuchs-Zeiten (Hyaluronidase)	1	133	133	4.43	5 %
Rest - Varianz	25	760	30		
Gesamt - Varianz	35	29.054	830		

n = 5; $\chi^2_{\text{emp.}} = 8.353$; 10 % < p.

	$\bar{x}(V)$	$s^2(V)$	$\bar{x}(t) - \bar{x}(K)$	Hemmung	Sicherung
E _V	126	14			
H _V	191	119			
E _{120'}	117	19	- 9		0.1 %
H _{120'}	157	25	- 34	46.6 %	0.1 %
E _{150'}	115	29	- 11		0.1 %
H _{150'}	164	45	- 27	37.2 %	0.1 %

FORAFIN + AVIL

20' und 40'

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	F.
Zwischen Tieren	5	3.575	715	23*06	0*1 %
Zwischen Verfahren	5	40.115	8.023	100*00	0*1 %
Zw. Quaddel-Typen	1	38.809	38.809	100*00	0*1 %
Zw. Kontr.u.V.-Zeiten (Farbstoff)	1	8	8	-	
Zw. Versuchs-Zeiten (Farbstoff)	1	14	14	-	
Zw. Kontr.u.V.-Zeiten (Hyaluronidase)	1	910	910	29*35	0*1 %
Zw. Versuchs-Zeiten (Hyaluronidase)	1	374	374	12*06	1 %
Rest - Varianz	25	773	31		
Gesamt - Varianz	35	44.463	1.270		

n = 5; $\chi^2_{\text{emp.}} = 4.633$; P 30 % < p.

	$\bar{x}(V)$	$s^2(V)$	$\bar{x}(t) - \bar{x}(K)$	Hemmung	Sicherung
E _V	116	135			
H _V	193	250			
E _{20'}	119	77	+ 3		-
H _{20'}	184	168	- 9	12*5 %	1 %
E _{40'}	117	43	+ 1		-
H _{40'}	172	196	- 21	27*3 %	0*1 %

FORAPIN + AVIL

30' vorh. sc. und gleichzeitig

20' und 40'

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p.
Zwischen Tieren	5	1.734	347	9.64	0.1 %
Zwischen Verfahren	5	42.729	8.546	100.00	0.1 %
Zw. Quaddel-Typen	1	42.573	42.573	100.00	0.1 %
Zw. Kontr.u.V.-Zeiten (Farbstoff)	1	34	34	-	
Zw. Versuchs-Zeiten (Farbstoff)	1	37	37	1.03	-
Zw. Kontr.u.V.-Zeiten (Hyaluronidase)	1	15	15	-	
Zw. Versuchs-Zeiten (Hyaluronidase)	1	70	70	1.94	-
Rest - Varianz	25	901	36		
Gesamt - Varianz	35	45.364	1.296		

n = 5; $\chi^2_{emp.} = 5.556$; 30 % < p.

	$\bar{x}(v)$	$s^2(v)$	$\bar{x}(t) - \bar{x}(K)$	Hemmung	Sicherung
E _v	121	109			
H _v	193	87			
E _{20'}	122	35	+ 1		-
H _{20'}	189	104	- 4	6.2 %	-
E _{40'}	126	27	+ 5		-
H _{40'}	193	164	0	- 0.7 %	-

FORAPIN + ERGOTAMIN

20' und 40'

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p.
Zwischen Tieren	5	1.388	278	3.91	1 %
Zwischen Verfahren	5	35.208	7.042	99.18	0.1 %
Zw. Quaddel-Typen	1	33.367	33.367	100.00	0.1 %
Zw. Kontr.u.V.-Zeiten (Farbstoff)	1	54	54	-	
Zw. Versuchs-Zeiten (Farbstoff)	1	40	40	-	
Zw. Kontr.u.V.-Zeiten (Hyaluronidase)	1	1.056	1.056	14.87	0.1 %
Zw. Versuchs-Zeiten (Hyaluronidase)	1	690	690	9.72	1 %
Rest - Varianz	25	1.771	71		
Gesamt - Varianz	35	38.367	1.096		

$n = 5; \chi^2_{\text{emp.}} = 3.092; 50 \% < p.$

	$\bar{x}(V)$	$s^2(V)$	$\bar{x}(t) - \bar{x}(K)$	Hemmung	Sicherung
E_V	113	216			
H_V	187	119			
$E_{20'}$	118	95	+ 5		-
$H_{20'}$	178	77	- 9	12.0 %	1 %
$E_{40'}$	115	60	+ 2		-
$H_{40'}$	163	64	- 24	33.1 %	0.1 %

F O R A P I N + E R G O T A M I N

30' vorh. so. und gleichzeitig

20' und 40'

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p.
ischen Tieren	5	2.099	420	84*00	0*1 %
ischen Verfahren	5	45.608	9.122	100*00	0*1 %
w. Quaddel-Typen	1	45.156	45.156	100*00	0*1 %
w. Kontr.u.V.-Zeiten (Farbstoff)	1	81	81	1*76	-
w. Versuchs-Zeiten (Farbstoff)	1	33	33	-	-
w. Kontr.u.V.-Zeiten (Hyaluronidase)	1	289	289	6*28	1 %
w. Versuchs-Zeiten (Hyaluronidase)	1	48	48	1*04	-
t - Varianz	25	1.142	46		
amt - Varianz	35	48.849	1.396		

5; $\chi^2_{emp.} = 6.333$; 20 $\nless p$.

	$\bar{x}(V)$	$s^2(V)$	$\bar{x}(t) - \bar{x}(K)$	Hemmung	Sicherung
E _V	122	59			
H _V	196	232			
E _{20'}	119	90	- 3		-
H _{20'}	189	122	- 7	8*5 %	1 %
E _{40'}	116	25	- 6		-
H _{40'}	185	119	- 11	13*7 %	1 %

FOCRAPIN + PROTAMINSULFAT

sofort u. 30' nachgespritzt

20' und 40'

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p.
Zwischen Tieren	5	2.926	585	9.14	0.1 %
Zwischen Verfahren	5	31.771	6.354	99.28	0.1 %
Zw. Quaddel-Typen	1	31.093	31.093	100.00	0.1 %
Zw. Kontr.u.V.-Zeiten (Farbstoff)	1	8	8	-	
Zw. Versuchs-Zeiten (Farbstoff)	1	16	16	-	
Zw. Kontr.u.V.-Zeiten (Hyaluronidase)	1	23	23	-	
Zw. Versuchs-Zeiten (Hyaluronidase)	1	631	631	9.86	1 %
Rest - Varianz	25	1.590	64		
Gesamt - Varianz	35	36.287	1.037		

$n = 5$; $\chi^2_{\text{emp.}} = 7.450$; $10 \% < p.$

	$\bar{x}(V)$	$s^2(V)$	$\bar{x}(t) - \bar{x}(K)$	Hemmung	Sicherung
E _v	122	111			
H _v	121	273			
E _{20'}	119	35	- 3		-
H _{20'}	172	169	- 9	16.0 %	1 %
E _{40'}	122	58	0		-
H _{40'}	126	257	+ 5	- 8.0 %	-

F O R A P I N + P E N D I O M I D

20' und 40'

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p.
Zwischen Tieren	5	853	171	4.50	1 %
Zwischen Verfahren	5	35.757	7.151	100.00	0.1 %
Zw. Quaddel-Typen	1	35.407	35.407	100.00	0.1 %
Zw. Kontr.u.V.-Zeiten (Farbstoff)	1	201	201	5.29	5 %
Zw. Versuchs-Zeiten (Farbstoff)	1	-	-		
Zw. Kontr.u.V.-Zeiten (Hyaluronidase)	1	93	93	2.45	-
Zw. Versuchs-Zeiten (Hyaluronidase)	1	56	56	1.47	-
Rest - Varianz	25	957	38		
Gesamt - Varianz	35	37.567	1.073		

n = 5; $\frac{2}{\text{emp.}} = 0.052$; 99 % p.

	$\bar{x}(V)$	$s^2(V)$	$\bar{x}(t) - \bar{x}(K)$	Hemmung	Sicherung
E _V	111	64			
H _V	182	71			
E _{20'}	118	58	+ 7		5 %
H _{20'}	179	65	- 3	4.0 %	-
E _{40'}	118	49	+ 7		5 %
H _{40'}	175	55	- 7	10.6 %	-

adrenalektomierte Tiere

F O R A P I N

20' und 40'

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p.
Zwischen Tieren	5	948	190	5.76	1 %
Zwischen Verfahren	5	39.287	7.857	100.00	0.1 %
Zw. Quaddel-Typen	1	38.678	38.678	100.00	0.1 %
Zw. Kontr.u.V.-Zeiten (Farbstoff)	1	5	5	-	
Zw. Versuchs-Zeiten (Farbstoff)	1	10	10	-	
Zw. Kontr.u.V.-Zeiten (Hyaluronidase)	1	529	529	16.03	0.1 %
Zw. Versuchs-Zeiten (Hyaluronidase)	1	65	65	1.97	-
Rest - Varianz	25	823	33		
Gesamt - Varianz	35	41.058	1.173		

$n = 5; \chi^2_{\text{emp.}} = 2.597; 70\% < p.$

	$\bar{x}(V)$	$s^2(V)$	$\bar{x}(t) - \bar{x}(K)$	Hemmung	Sicherung
E_V	118	70			
H_V	191	83			
$E_{20'}$	118	29	0		-
$H_{20'}$	182	79	- 9	12.5 %	0.1 %
$E_{40'}$	116	29	- 2		-
$H_{40'}$	177	65	- 14	18.9 %	0.1 %

hypophysektomierte Tiere

F O R A P I N

20' und 40'

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p.
Zwischen Tieren	4	214	53	2.52	5 %
Zwischen Verfahren	5	24.878	4.976	100.00	0.1 %
Zw. Quaddel-Typen	1	7.395	7.395	100.00	0.1 %
Zw. Kontr.u.V.-Zeiten (Farbstoff)	1	-	-		
Zw. Versuchs-Zeiten (Farbstoff)	1	5	5	-	
Zw. Kontr.u.V.-Zeiten (Hyaluronidase)	1	17.376	17.376	100.00	0.1 %
Zw. Versuchs-Zeiten (Hyaluronidase)	1	102	102	4.86	5 %
Rest - Varianz	20	417	21		

Gesamt - Varianz 29 25.509 880

n = 5; $\frac{2}{\text{emp.}} = 4.807$; 30 % p.

	$\bar{x}(V)$	$s^2(V)$	$\bar{x}(t) - \bar{x}(K)$	Hemmung	Sicherung
E_V	116	14			
H_V	195	54			
$E_{20'}$	116	42	0		-
$H_{20'}$	126	13	- 69	86.7 %	0.1 %
$E_{40'}$	115	25	- 1		-
$H_{40'}$	120	9	- 75	94.7 %	0.1 %

Diskussion

Die Versuchsergebnisse haben zunächst die hyaluronidasehemmende Wirkung des Bienengiftes, das wie bei der rheumatherapeutischen Anwendung in Form von Hautquaddeln appliziert wurde, nachgewiesen. Die Hemmung der Hyaluronidaseaktivität zeigt im Vergleich zu anderen antirheumatisch wirksamen Substanzen ein beträchtliches Ausmaß. Wenn Chain und Duthie³⁵ im Bienengift eine Hyaluronidase festgestellt haben, so kann diese nicht die auf anderem Wege zustandekommende Hyaluronidasewirkung beeinflusst haben. Eine solche Allgemeinwirkung kann bei der lokalen Applikation in Form einer Hautquaddel auch nicht angenommen werden. Es ist lediglich zu diskutieren, ob die im Bienengift enthaltene Hyaluronidase lokal die Aufnahme und Ausbreitung der Wirkstoffe erleichtert. In unseren Versuchen fiel jedoch ein rasches Verlaufen der intrakutan injizierten Forapinmenge, wie man sie durch eine Hyaluronidasewirkung erwarten sollte, nicht auf. Ebenso wenig bot das Aussehen der Forapinquaddel einen Anhalt für eine lokale Rötung, wie man sie auf Grund einer Histaminwirkung annehmen sollte. Es dürfte also weder eine Hyaluronidasewirkung noch ein Histamineffekt lokal in nennenswertem Maße vorhanden gewesen sein. Auch ist von der lokalen Applikationsstelle aus eine direkte Hyaluronidase-Histaminwirkung nicht anzunehmen.

Der durch die vorgelegte Arbeit erwiesene hyaluronidasehemmende Effekt ist in anderen Wirkstoffen zu suchen. Diese weisen anscheinend den gleichen Wirkungsmechanismus auf, wie er bei dem hyaluronidasehemmenden Effekt der Salizylate, Pyrazolone, Nebennierenrinden-Hormonderivaten usw. vorliegt und der eingangs ausführlicher dargestellt wurde. Dies geht daraus hervor, daß der hyaluronidasehemmende Effekt des Bienengiftes bei adrenalectomierten Ratten ausbleibt, bei hypophysektomierten Tieren erhalten ist und durch Pendiomid, Ergotamintartrat, Protaminsulfat und Avil blockiert oder zumindest weitgehend reduziert wird.

Um den blockierenden Effekt des verwendeten Adrenalytikums und des Antihistaminikums deutlicher zu machen, war es notwendig, verschiedene Applikationszeiten anzuwenden, die entsprechend der Wirkungsauer der blockierenden Stoffe ihren hemmenden Einfluß zu den betreffenden Versuchszeiten hervortreten ließen.

Interessant ist, daß nach den Arbeiten von Neumann²⁹ und Feldberg³⁰ die Freisetzung körpereigenen Histamins bereits nachgewiesen wurde, dessen Bedeutung im Wirkungsablauf hyaluronidasehemmender Substanzen von Mathies²² vermutet wurde. Diese Tatsache bildet eine weitere Stütze für diese Annahme. Damit dürfte die Hyaluronidasehemmung auch nicht eine direkte durch das im Bienengift enthaltene Histamin sein, sondern eine indirekte über eine Aktivierung des Nebennierenmarkes.

Zusammenfassung

Es wurde mit Hilfe einer auf den Spreading-Effekt beruhenden Farbstoff-Hyaluronidase-Quaddelmethode die hyaluronidasehemmende Wirkung des Bienengiftes bei der therapeutisch angewandten Applikation intrakutaner Hautquaddeln nachgewiesen. Dieser hemmende Effekt ist durch Adrenalektomie, Ganglienblocker, Adrenalytika, Antihistaminika und Heparin-inaktivierender Substanzen aufzuheben, bleibt jedoch nach Hypophysektomie erhalten. Auf Grund bereits vorliegender Untersuchungen über die Wirkungsweise hyaluronidasehemmender Stoffe wird die im Bienengift gleichermaßen vorliegende Wirkungsweise diskutiert. Dabei wird eine Histaminfreisetzung aus den Mastzellen als Faktor im Wirkungsablauf besonders hervorgehoben, was dadurch an Bedeutung gewinnt, daß durch andere Autoren eine Freisetzung körpereigenen Histamins durch Bienengift bereits nachgewiesen werden konnte.

Literaturverzeichnis

- 1) Mathies, H.: Med. Klin. 52, 1676 (1957) dort weitere Lit.
- 2) Mathies, H. u. Jankowski, A.: Klin. Wschr. 35, 892 (1957)
- 3) Mathies, H.: Arzneim. Forsch. 8, 233 (1958)
- 4) Mathies, H.: Med. Mschr. 11, 791 (1957)
- 5) Mathies, H., Biechele, I. u. Hartmann, M.: Arzneim. Forsch.
im Druck
- 6) Mathies, H. u. v. Werther, G.: Arzneim. Forsch. 9, 576 (1959)
- 7) Mathies, H.: VI. Int. Kongreß f. univ. Moorforsch.
Juni 1958 Brüssel u. Spa
- 8) Mathies, H. u. v. Werther, G.: Zschr. f. angew. Bäder- u.
Klimak. 5, 582-589 (1958)
- 9) Mathies, H.: Zschr. f. Rheumaforsch. Bd 17, 375 (Okt. 1958)
- 10) Mathies, H.: Zschr. f. Rheumaforsch. Bd 18, 308 (Aug. 1959)
- 11) Domenjoz, R.: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. 225, 14 (1955)
- 12) Sayers, G. u. Sayers, M.: Endocrinology 40, 256 (1947)
- 13) Mathies, H.: Zschr. f. Rheumaforsch. Bd. 18, 205 (Juno 1959)
- 14) Mathies, H.: Arch. Int. Pharmacodyn. et Ther. im Druck
- 15) Scheufele, R.: Diss. München, in Vorbereitung
- 16) Schmidt, D.: Diss. München, in Vorbereitung
- 17) Mathies, H., Glück, A., Poulantzas, J. u. Schmidt, D.:
Med. exp. 1, 64-68 (1959)
- 18) Eichholtz, F.: Int. Pharmacy a. Pharmacol. London 7, 497
(1955)
- 19) Mathies, H., Österreich, G. u. Schwalbach, K.: in Vorber.
- 20) Mathies, H. u. Weiß, G.: in Vorbereitung
- 21) Mathies, H. u. Vogel, M.: in Vorbereitung
- 22) Mathies, H.: Vorh. d. Ges. f. In. Med. 65, 447 (1958)
- 23) Neumann, W. u. Habermann, E.: Arch. exper. Path. u. Pharmacol.
Bd 222, 367-387 (1954)
- 24) Nagamitu, G.: Okayama-Iggakkai-Zasshi 47, 3005 (1935) Zit.
nach Ber. Ges. Physiol. 95, 128 (1936)
- 25) Reinert, M.: Festschr. E. Barell, Basel 1936 407
- 26) Tetsch, Chr. u. Wolff, K.: Biochem. Zschr. 288, 126 (1936)
- 27) Ackermann, D. u. Mauer, H.: Arch. f. Physiol. 247, 623 (1944)
- 28) Dirr, K. u. Graeber, H.: Klin. Wschr. J 15, Nr. 41 1483-1485
- 29) Neumann, W.: Ber. d. Phys. Med. Ges. Würzburg Bd 66, 166 (1953)

- 30) Feldberg, W. u. Kellaway, C.H.: Austral. J. Exper. Biol. 1a.
Med. Sci. 15. 461 (1937)
- 31) Madinaveitia, J.: Biochemie J32, 1806 (1938)
- 32) Gibian, H.: Erg. d. Enzymforsch. 13, 1 (1954)
- 33) Wilhelmi, G.: Zit. Domenjoz 11
- 34) Karg, H.: persönliche Mitteilung
- 35) Chain, E. u. Duthie, E.S.: Brit. J. Exper. Path. 21, 324 (1940)

Ich danke Herrn Professor Dr. W. Seitz für die Überlassung des Themas und Herrn Dr. H. Mathies für die Anregung zu dieser Arbeit und die Unterstützung bei der Bearbeitung des Themas. Herrn Dipl.-Math. K. Liebrich bin ich für die Durchführung der statistischen Berechnungen dankbar.

Die Versuchssubstanz Forapin wurde uns freundlicherweise von der Firma Heinrich Mack Nachf., Illertissen zur Verfügung gestellt.

Diese Arbeit ist meinen Eltern gewidmet

Lebenslauf

Am 7. April 1934 wurde ich in Duisburg geboren. Hier besuchte ich vier Jahre die Volksschule und wechselte mit der Hauptschulreife für zwei Tertiäle zum Neusprachlichen-Gymnasium nach Rheinhausen. Als Ende 1944 die Schule wegen Kriegseinwirkungen geschlossen wurde, zogen wir nach Gerstetten/Württemberg. Anfang 1946 nach Duisburg zurückgekehrt, besuchte ich dort anderthalb Jahre das Staatliche Landfermann-Gymnasium. Mitte 1948 trat ich in die Klosterschule der Kamillianer zu Neuß ein, besuchte dort zwei Tertiäle das Quirinus-Gymnasium und anschließend die Private Vorbereitungsanstalt der Kamillianer, die ich Ostern 1952 mit Obersekundareife verließ. Darauf besuchte ich in Duisburg die Oberstufe des Staatlichen Landfermann-Gymnasiums und absolvierte dort Februar 1955 mein Abitur.

Im Mai 1955 begann ich mein Studium an der medizinischen Fakultät der Universität Bonn, wechselte im dritten Semester zur Universität Marburg, kehrte im darauffolgenden Semester wieder nach Bonn zurück und schloß dort nach dem fünften Semester mein vorklinisches Studium am 29. Oktober 1957 mit der ärztlichen Vorprüfung ab. Gleichzeitig ließ ich mich ins Album der philosophischen Fakultät der Universität Bonn eintragen, um Philosophie und Psychologie als Zweitstudium zu betreiben. Das erste klinische Semester blieb ich an der dortigen Universität und setzte darauf mein Studium zwei Semester an der Universität Wien fort. Während der Sommersemesterferien 1958 wurde ich von der Universität Bonn als Austauschstudent zur medizinischen Fakultät der Universität Izmir/Türkei geschickt. Im April 1959 schrieb ich mich an der Münchener Universität ein und beendete hier nach drei weiteren Semestern mein Studium mit der ärztlichen Prüfung im Herbst 1960.

